昆虫学报 *Acta Entomologica Sinica*, August 2017, 60(8): 847 -856 doi:10.16380/j.kcxb.2017.08.001

miRNA 调控昆虫精巢干细胞自我更新相关基因的保守性分析和靶标验证

马行洲[1], 李 飞[1,2,*]

(1. 南京农业大学植物保护学院, 南京 210095; 2. 浙江大学昆虫科学研究所, 杭州 310058)

摘要:【目的】发现昆虫精巢干细胞自我更新相关基因3′UTR上的保守miRNA靶位点,为深入研究昆虫精子发生进程中的miRNA-基因调控关系提供参考。【方法】使用Blast搜索27种全变态昆虫精巢干细胞自我更新相关基因,并预测这些基因的3′UTR。使用TargetScan预测这些基因3′UTR上的miRNA靶位点。对家蚕 *Bombyx mori* 和小菜蛾 *Plutella xylostella* 的 *Chinmo* 和 *Imp* 基因包含let-7-5p靶标点的3′UTR序列进行了克隆,使用双荧光素酶报告系统对其靶标关系进行验证。【结果】在27种全变态昆虫中发现了17个精巢干细胞自我更新相关基因。利用TargetScan在这些基因的3′UTR上预测到了203个保守的miRNA靶位点。其中 *Zfh*-1, *Chinmo*, *Ken* 及 *Imp* 的3′UTR上存在大量的miRNA靶位点,但miRNA靶位点数目在不同昆虫类群中也存在很大差异。其中, *Chinmo* 及 *Imp* 3′UTR上的let-7-5p靶位点在昆虫中保守。分别克隆了家蚕和小菜蛾 *Chinmo* 和 *Imp* 的3′UTR,通过双荧光素酶报告系统转染239T细胞证实了let-7-5p对 *Chinmo* 和 *Imp* 两个基因的调控作用。【结论】发现在4个昆虫精巢干细胞自我更新相关基因 *Zfh*-1, *Chinmo*, *Ken* 和 *Imp* 的3′UTR上存在大量的miRNA靶标位点。其中 *Chinmo* 及 *Imp* 基因3′UTR上let-7-5p靶位点在大多数全变态昆虫中保守,双荧光素酶报告系统实验证实了家蚕和小菜蛾中let-7-5p与 *Chinmo* 和 *Imp* 存在相互作用,为进一步研究miRNA在昆虫精子发生进程中的功能提供了参考。

关键词: 昆虫; 家蚕; 小菜蛾; 精巢; 干细胞; 自我更新; miRNA靶标; 3′UTR

中图分类号: Q966 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2017)08-0847-10

Function validation and evolution analysis of miRNA regulation of insect testis stem cell self-renewal associated genes

MA Xing-Zhou[1], LI Fei[1,2,*] (1. College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Institute of Insect Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract:【Aim】To search conserved miRNA target sites on the 3′UTRs of insect testis stem cell self-renewal associated genes, and to provide references for studying the miRNA-gene relationship in the process of insect spermatogenesis.【Methods】Testis stem cell self-renewal associated genes were identified in 27 holometabolan insects by BLAST search, and the 3′ UTRs of these genes were predicted. The miRNA target sites on the 3′UTRs of these genes were predicted by using TargetScan. The 3′UTRs of *Chinmo* and *Imp* containing let-7-5p target site of *Bombyx mori* and *Plutella xylostella* were cloned, and the target-gene relationship was verified by dual-luciferase reporter system.【Results】Seventeen testis stem cell self-renewal associated genes were identified in 27 holometabolan insects. By using TargetScan, 203 miRNA target sites were identified. A high number of conserved miRNA target sites were found on the 3′UTRs of *Zfh*-1, *Chinmo*, *Ken* and *Imp*. The number of conserved miRNA target sites was different among various insects. The let-7-5p target sites on *Chinmo* and *Imp* were conserved in insects and could be confirmed by other miRNA target prediction programs. The 3′UTRs of these two genes were cloned

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFC1200602)
作者简介: 马行洲, 男, 1990年8月生, 浙江杭州人, 硕士研究生, 研究方向为昆虫分子生物学, E-mail: zxmlmq@163.com
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: lifei18@zju.edu.cn
收稿日期 Received: 2017-04-18; 接受日期 Accepted: 2017-06-21

from *B. mori* and *P. xylostella*. The dual-luciferase reporter system in 293T cells validated the regulation of let-7-5p on *Chinmo* and *Imp* from these two insect species. 【Conclusion】In this study, a large number of miRNA target sites were found on the 3′ UTRs of *Zfh*-1, *Chinmo*, *Ken* and *Imp*. The let-7-5p target sites on 3′UTRs of *Chinmo* and *Imp* are conserved in holometabolan insects. The target relationships between let-7-5p and *Chinmo* or *Imp* genes of *B. mori* and *P. xylostella* were verified by dual luciferase reporter system. This study will be helpful for better understanding the functions of miRNA in insect spermatogenesis.

Key words: Insect; *Bombyx mori*; *Plutella xylostella* testis; stem cell; self-renewal; miRNA target site; 3′UTR

昆虫的精巢是昆虫精子发生及成熟的重要场所(Gillott, 2005)。在昆虫精巢小管的端部存在 3 种形态学差异显著的细胞:顶端细胞(apical cells)(又称 hub 细胞)、生殖干细胞(germline stem cells, GSCs)和包囊干细胞(cyst stem cells, CySCs)。生殖干细胞和包囊干细胞均能发生不对称分裂,其中仍保持与顶端细胞相接触的子细胞仍维持干细胞的命运,而离开顶端细胞的子细胞发生分化,其中生殖干细胞的子细胞分化为精原母细胞(gonialblast),而包囊干细胞的子细胞分化为包囊细胞(cyst cell)(Hardy *et al*., 1979; King and Akai, 1984; Klowden, 2013)。两个包囊细胞通过细胞质扩展包被精原母细胞形成包囊(cyst),而精原母细胞在包囊内经历一系列分化及减数分裂,最终分化形成具有鞭毛的精子(Klowden, 2013)。生殖干细胞和包囊干细胞均为干细胞,其自我更新命运的维持或分化,由其所在精巢小管端部特殊微环境(niche)中的分子信号决定(de Cuevas and Matunis, 2011)。对黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 的研究显示,JAK-STAT 信号通路及 Bmp 信号通路在精巢干细胞自我更新命运的决定中起了重要的作用(de Cuevas and Matunis, 2011; Matunis *et al*., 2012; Zoller and Schulz, 2012)。顶端细胞通过产生糖蛋白配体 Upd 激活其邻接干细胞的 JAK-STAT 信号通路(Kiger *et al*., 2001; Tulina and Matunis, 2001)。在包囊干细胞中,JAK-STAT 信号通路的激活会开启包囊干细胞自我更新因子 *Zfh*-1 及 *Chinmo* 的表达,进而维持包囊干细胞的自我更新命运(Leatherman and Dinardo, 2008; Flaherty *et al*., 2010);在生殖干细胞中,JAK-STAT 信号通路的激活会增加其钙粘蛋白(E-cadherin)的表达,从而促进其与顶端细胞的黏附(Leatherman and Dinardo, 2010)。而顶端细胞及包囊干细胞均能产生 Bmp 配体 Dpp 和 Gbb,激活生殖干细胞中的 Bmp 信号通路,抑制促分化基因 *bag-of-marbles* (*bam*)在生殖干细胞中的转录,从而抑制生殖干细胞的分化(Kawase *et al*., 2004)。

MiRNA 是一种长度为 22 nt 左右的内源性非编码 RNA,可通过介导靶基因 mRNA 的降解或翻译抑制,参与大量基因调控网络,在包括细胞生长、增殖和分化的个体代谢和发育进程中起重要作用(He and Hannon, 2004; Ameres and Zamore, 2013)。miRNA 主要作用于蛋白编码基因的 3′UTR,但也可作用于 CDS 和 5′UTR。但通常认为,发挥最主要作用的区域应该为 3′UTR (Zhou *et al*., 2009)。此前的研究显示,miRNA 在果蝇精巢干细胞的命运决定中起了重要的作用。Hatfield 等(2005)发现 miRNA 生物合成通路基因 *dicer*-1 的突变会导致其生殖干细胞周期控制的缺陷。Pek 等(2009)发现,miR-7 通过作用于 *bam* 基因的 3′UTR 抑制其表达,并抑制生殖干细胞的分化,而 Maelstrom (*mael*)基因通过抑制 miR-7 的转录促进 Bam 蛋白的产生,从而促进生殖干细胞的分化。Eun 等(2013)发现,miR-275 和 miR-306 通过作用 *bam* 基因的 3′UTR 抑制其在精母细胞中的翻译,从而保证了精母细胞的正常分化。Toledano 等(2012)发现,IGF-II mRNA 结合蛋白 Imp 可与 *upd* 基因的 mRNA 结合以防止其被内源 siRNA 降解,而 let-7 通过作用于 *Imp*,降低 *upd* 在年老果蝇精巢中的表达,从而导致生殖干细胞的减少。这些结果表明,miRNA 广泛地参与调控果蝇精巢干细胞命运的决定。然而,以往的研究大多局限于模式生物黑腹果蝇。为了更全面地了解 miRNA 在昆虫精子发生进程中的作用,本研究以 19 个昆虫精巢干细胞自我更新相关基因为研究对象,选择基因组注释质量比较高的 27 种全变态昆虫进行保守性分析,并在细胞水平上验证了家蚕 *Bombyx mori* 和小菜蛾 *Plutella xylostella* miRNA let-7-5p 与 *Chinmo* 及 *Imp* 基因的靶标关系,为进一步揭示 miRNA 在非模式昆虫精子发生进程中的功能提供参考。

1　材料与方法

1.1　物种及基因的选择

选取 27 种全变态昆虫作为研究对象(表 1)。这些物种的基因组信息下载自美国国家生物技术信息中心(NCBI，http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)和 InsectBase(www.insect-genome.com/)(Yin *et al.*, 2016)。

表 1　物种的选择及分类

Table 1　Species selection and grouping

类群 Group	物种 Species
膜翅目 Hymenoptera	黄翅菜叶蜂 *Athalia rosae*
	尾蜂 *Orussus abietinus*
	榕小蜂 *Ceratosolen solmsi*
	丽蝇蛹集金小蜂 *Nasonia vitripennis*
	侧沟茧蜂 *Microplitis demolitor*
	佛罗里达弓背蚁 *Camponotus floridanus*
	西方蜜蜂 *Apis mellifera*
鞘翅目 Coleoptera	白蜡吉丁 *Agrilus planipennis*
	金龟 *Onthophagus taurus*
	赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*
	光肩星天牛 *Anoplophora glabripennis*
	马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata*
	山松大小蠹 *Dendroctonus ponderosae*
鳞翅目 Lepidoptera	沼石蛾 *Limnephilus lunatus*
	小菜蛾 *Plutella xylostella*
	家蚕 *Bombyx mori*
	烟草天蛾 *Manduca sexta*
	君主斑蝶 *Danaus plexippus*
	诗神袖蝶 *Heliconius melpomene*
	庆网蛱蝶 *Melitaea cinxia*
双翅目 Diptera	埃及伊蚊 *Aedes aegypti*
	冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*
	致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus*
	地中海实蝇 *Ceratitis capitata*
	瓜实蝇 *Bactrocera cucurbitae*
	家蝇 *Musca domestica*
	黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*

昆虫精巢干细胞自我更新相关基因的选择主要基于 Matunis 等对果蝇精巢干细胞微环境的综述(Matunis *et al.*, 2012)。主要包括 JAK-STAT 信号通路及 Bmp 信号通路中的主要元件，及其下游的靶标基因(表 2)。

1.2　蛋白序列的搜索

选定 19 个基因在黑腹果蝇中的蛋白序列下载自 FlyBase(http://flybase.org/)。将其作为 query，使用 Blastp 搜索 NCBI RefSeq 数据(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)，ebi-metazoa 数据库(http://metazoa.ensembl.org/index.html)及 BCM-HGSC 数据库(https://www.hgsc.bcm.edu/arthropods)中的昆虫蛋白注释信息，同时使用 tblastn 搜索本实验室此前拼接的昆虫转录组数据。使用 mafft(Katoh and Standley, 2013)对每个基因不同物种的蛋白序列进行序列比对，随后使用 PhyML3.0(Guindon *et al.*, 2010)构建系统发育树以确保基因的直系同源性。

1.3　3′UTR 序列的预测

使用 TopHat2(Kim *et al.*, 2013)将本实验室此前收集的昆虫转录组数据比对到其对应物种的基因组上。随后使用 tblastn 确定各基因终止密码子在对应物种基因组上的位置，并通过 Python 脚本截取终止密码子下游被转录组 reads 覆盖到的区域，作为潜在的 3′UTR 序列。本实验采用的方法获得的 3′UTR，与转录组的质量具有密切的关系，但由于目前转录组的数量比较多，综合分析后可显著提高质量，提供大量有用的序列信息。

1.4　3′UTR 序列的比对及保守 miRNA 靶位点的预测

将 27 种昆虫根据其系统发育关系分为膜翅目、鞘翅目、鳞翅目及双翅目 4 个类群。使用 Dialign2.2(Morgenstern, 1999)对每个类群各基因的 3′UTR 序列进行比对。随后将本实验室此前预测获得的昆虫 miRNA 成熟体序列作为 query，使用 TargetScan 在比对完成的 3′UTR 上搜索潜在的保守 miRNA 靶标。选择在一个昆虫类群中 3 个以上的物种中保守的 7mer 及 8mer miRNA 靶位点作为潜在的 miRNA 靶标位点。使用另外 3 种靶标预测程序 Miranda(Enright *et al.*, 2003)，Pita(Kertesz *et al.*, 2007)和 RNAhybrid(Kruger and Rehmsmeier, 2006)在 *Imp*，*Chinmo*，*Zfh*-1 和 *Ken* 等基因 3′UTR 上作进一步预测。这 3 种程序的评判标准分别为 Miranda(score ≥140，Energy ≤ −20)、Pita(score ≤ −10)和 RNAhybird(mfe≤ −20 kcal/mol)。

1.5　家蚕及小菜蛾 *Chinmo* 和 *Imp* 基因 let-7-5p 靶位点序列的克隆

家蚕3龄幼虫由中国农业科学院蚕业研究所李

表 2 选取的昆虫精巢干细胞自我更新相关基因

Table 2 Selected insect testis stem cell self-renewal associated genes

基因 Genes	描述 Description
JAK-STAT 信号通路的组成元件 Components of JAK-STAT signaling pathway	
Unpaired 1(*Upd*1)	JAK-STAT 信号通路的配体 The ligand of JAK-STAT signaling pathway(Arbouzova and Zeidler, 2006)
Domeless (*Dome*)	JAK-STAT 信号通路的受体 The receptor of JAK-STAT signaling pathway
Hopscotch (*Hop*)	JAK
Signal-transducer and activator of transcription protein at 92E gene (*Stat92E*)	STAT
JAK-STAT 信号通路的下游基因 Downstream genes of JAK-STAT signaling pathway	
Zinc-finger homeodomain protein 1 gene (*Zfh*-1)	包囊干细胞自我更新维持因子 Cyst stem cell self-renewal factor (Leatherman and Dinardo, 2008)
Chronologically inappropriate morphogenesis gene (*Chinmo*)	包囊干细胞自我更新维持因子 Cyst stem cell self-renewal factor (Flaherty *et al*., 2010)
Suppressor of cytokine signaling at 36E gene (*Socs36E*)	JAK-STAT 信号通路的负调控因子 Negative regulatory factor of JAK-STAT signaling pathway (Issigonis *et al*., 2009)
Shotgun (*Shg*)	钙粘蛋白,促进生殖干细胞粘附 hub 细胞 E-cadherin, adhere germline stem cells to hub cells (Leatherman and Dinardo, 2010)
Bmp 信号通路的组成元件 Components of Bmp signaling pathway	
Decapentaplegic (*Dpp*)	Bmp 信号通路的配体 The ligand of Bmp signaling pathway (Kawase *et al*., 2004)
Glass bottom boat (*Gbb*)	Bmp 信号通路的配体 The ligand of Bmp signaling pathway
Punt (*Put*)	Bmp 信号通路的类型 Ⅱ 受体 Type II receptor of Bmp signaling pathway (Gilbert, 2012)
Saxophone (*Sax*)	Bmp 信号通路的类型 Ⅰ 受体 Type I receptor of Bmp signaling pathway
Thickveins (*Tkv*)	Bmp 信号通路的类型 Ⅰ 受体 Type I receptor of Bmp signaling pathway
Mothers against dpp (*Mad*)	R-Smad
Medea (*Med*)	Co-Smad
其他 Others	
Bag of marbles (*Bam*)	生殖干细胞分化因子, 受 Bmp 信号通路的负调控 Germline stem cell self-renewal factor, negatively regulated by Bmp signaling pathway
IGF-II mRNA-binding protein gene (*Imp*)	结合并保护 *upd* 的 mRNA,防止其被内源 siRNA 降解 Binding and protecting upd mRNA from siRNA-mediated degradation (Toledano *et al*., 2012)
Ken and barbie (*Ken*)	包囊干细胞的自我更新因子 Cyst stem cell self-renewal factor (Issigonis and Matunis, 2012)
Magu	在生殖干细胞中调控 Bmp 信号通路 Regulating Bmp signaling pathway in germline stem cells (Zheng *et al*., 2011)

木旺研究员友情提供，小菜蛾 4 龄幼虫饲养于浙江大学昆虫科学研究所。使用 Trizol（Invitrogen）分别提取家蚕和小菜蛾总 RNA，提取方法参考说明书。使用 Nano Drop 1000 核酸蛋白分析仪检测核酸 RNA 的纯度及浓度，取 1 μg 总 RNA，使用 SMARTer® RACE5′/3′ Kit（TaKaRa）进行反转录合成 cDNA 模板。根据家蚕及小菜蛾 *Chinmo* 和 *Imp* 基因 let-7-5p 靶位点及其上下游序列，利用 Premier 5.0 软件设计引物（表 3）。以家蚕和小菜蛾的 cDNA 为模板对 *Chinmo* 和 *Imp* 基因 let-7-5p 靶位点序列进行 PCR 克隆，PCR 反应体系（50 μL）：cDNA 1 μL，Premix Taq（Ex Taq Version 2.0）25 μL，上下游引物（10 μmol/L）各 1 μL，ddH_2O 22 μL。反应条件：94℃变性 3 min；94℃ 30 s，68℃ 30 s，72℃ 60 s，35 个循环；72℃ 10 min。将克隆得到目的片段 DNA，送至华大基因公司测序验证。

表 3 克隆家蚕及小菜蛾 *Chinmo* 和 *Imp* 基因 3′UTR 的引物

Table 3 Primer sequences used for cloning 3′UTR of *Chinmo* and *Imp* in *Bombyx mori* and *Plutella xylostella*

基因 Genes	引物序列（5′–3′） Primer sequences	PCR 产物长度（bp） PCR product length
Bm-Chinmo	F：CCTCTGCCGTCACACGGGCTTCGTAAGAAA	576
	R：CCTTCAACTCAGCACATTCGACTCGTTCACTTCC	
Px-Chinmo	F：CCGTTTGACTTGTGGCGATCACCCGAACT	826
	R：GCTGAGTTACAGAGTTGCCGAGTTACCGAGTTG	
Bm-Imp	F：AGCGTTACGAAATGACCATGACGTGGACAC	433
	R：TAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	
Px-Imp	F：GTTGCGTATGTGCAGGTGACGGATGCCATCAG	596
	R：TAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	

1.6 Let-7-5p 与 *Chinmo* 和 *Imp* 基因的靶标验证

将克隆获得家蚕及小菜蛾 *Chinmo* 和 *Imp* 基因的 3′UTR 片段分别连接到萤火虫荧光素酶载体（pMIR-Report Luciferase）荧光素酶（luciferase）基因 3′UTR 区域。将重组后的载体与海肾萤光素酶载体（Renilla）以 20∶1 的比例（v/v）转染到 293T 细胞中。同时在对照组中转染 NC mimics（与 let-7-5p 无序列相似性），而在实验组中转染 let-7-5p mimics。共转染 48 h 后，使用酶标仪（Infinite M1000，TECAN）测定萤火虫荧光素酶与海肾荧光素酶的活性。计算萤火虫荧光素酶活性值与海肾荧光素酶活性值的比值，以对照组的比值对实验组的比值进行归一化，并使用 Graphpad 软件进行差异显著性分析。

2 结果

2.1 全变态昆虫精巢干细胞自我更新相关基因的鉴定

由于果蝇以外昆虫的精巢干细胞自我更新相关基因缺乏注释，因此利用黑腹果蝇的精巢干细胞自我更新相关基因的蛋白序列进行同源搜索。在选定的 19 个精巢干细胞自我更新相关基因中，有 17 个基因其蛋白序列能在大多数全变态昆虫中被发现，且在大多数昆虫的基因组中只存在一个拷贝。而 Upd 和 Bam 蛋白序列并未在双翅目以外物种中发现，因此在后续的保守靶标搜索中不考虑这两个基因。为确保获得基因的直系同源性，本研究对获得的 17 个基因分别构建进化树，发现所有基因的进化树都能被很好地聚成膜翅目、鞘翅目、鳞翅目及双翅目 4 类，与全变态昆虫的系统发育关系一致。

2.2 精巢干细胞自我更新相关基因的保守性 miRNA 靶位点预测

在后生动物中，已知的大多数 miRNA 靶位点位于靶基因 mRNA 的 3′UTR 区域。有研究表明，miRNA 也可位于蛋白编码区及 5′UTR 上（Lytle *et al*.，2007；Forman *et al*.，2008），但进一步研究发现，翻译进程会抑制 miRNA 沉默复合体与编码区靶位点的结合，从而使 miRNA 缺少对该靶基因的翻译抑制能力，导致 miRNA 在非 3′UTR 区的作用功能较弱（Gu *et al*.，2009），因此本研究仅预测选定基因的 3′UTR 上的保守 miRNA 靶位点。由于大多数非模式昆虫缺乏 3′UTR 的注释信息，因此利用转录组数据预测昆虫精巢干细胞自我更新相关基因的 3′UTR 序列。使用 TargetScan 软件预测 miRNA 作用位点，在选定的 17 个基因中，找到了 203 个保守的

miRNA 靶位点(表 4)。在 203 个靶标位点中,有 153 个(约占全部的 76%)出现在 *Zfh*-1, *Chinmo*, *Ken* 和 *Imp* 这 4 个基因上。与这 4 个基因相比,JAK-STAT 信号通路和 Bmp 信号通路的元件基因只有较少的保守 miRNA 靶位点。在果蝇中,miR-279 被报道通过直接作用 *stat92E* 的 3′UTR 调控 JAK-STAT 信号通路(Yoon *et al*., 2011),然而并没有在任何昆虫类群的 *stat92E* 中发现 miR-279 的保守靶位点,表明 miR-279 与 *stat92E* 的靶标关系可能为果蝇所特有。

表 4 昆虫精巢干细胞自我更新相关基因的保守 miRNA 靶位点数

Table 4 Number of conserved miRNA target sites of insect testis stem cell self-renewal associated genes

基因 Genes	膜翅目 Hymenoptera	鞘翅目 Coleoptera	鳞翅目 Lepidoptera	双翅目 Diptera	总计 Total
Dome	2	0	1	0	3
Hop	0	0	0	0	0
Stat92E	0	0	0	2	2
Chinmo	5	7	30	2	44
Ken	8	6	15	1	30
Zfh-1	14	10	18	4	46
Imp	10	9	11	3	33
Scos36E	0	0	0	0	0
Shg	1	2	7	0	10
Dpp	2	4	1	0	7
Gbb	0	0	0	0	0
Put	3	3	0	1	7
Sax	0	2	0	0	2
Tkv	1	4	0	0	5
Mad	0	0	2	1	3
Med	0	0	7	0	7
Magu	1	0	2	1	4
总计 Total	47	47	94	15	203

保守 miRNA 靶位点的数目在不同昆虫类群中也存在很大差异。鳞翅目类群的保守靶位点数最多,而双翅目昆虫的保守靶位点数最少。在 *Chinmo* 和 *Ken* 基因中,鳞翅目的保守 miRNA 靶位点占据这些基因全部保守靶位点的 50% 以上。值得注意的是,在鳞翅目中保守的 94 个靶位点,只有 23 个能在沼石蛾 *Limnephilus lunatus* 中找到同源的靶标位点,推测鳞翅目特有的保守 miRNA 靶位点可能产生于鳞翅目和毛翅目分化之后。

为了进一步了解 *Imp*, *Chinmo*, *Ken* 和 *Zfh*-1 的保守 miRNA 靶位点,使用其他 3 种靶标预测程序即 Miranda, Pita 和 RNAhybird 对这 4 个基因的 miRNA 靶位点进行验证。假定如果一个靶位点能被较多的 miRNA 靶标预测程序预测得到,则该位点具有更高的可靠性。发现其中 3 个 miRNA 靶位点,*Chinmo* 的 let-7-5p 靶位点(*Chinmo*-let-7-5p)、*Imp* 的 let-7-5p 靶位点(*Imp*-let-7-5p)及 *Zfh*-1 的 miR-12-5p 靶位点(*Zfh*-1-miR-12-5p),保守地出现在 4 个全变态昆虫类群中,且能被其他 3 种靶标预测程序预测得到(图 1)。

2.3 *Chinmo* 和 *Imp* 是 let-7 家族的保守靶标

Let-7 与 *Chinmo* 及 *Imp* 的靶标关系之前已在黑腹果蝇中被报道(Wu *et al*., 2012; Toledano *et al*., 2012)。本研究发现该靶标位点在全变态昆虫中保守,如图 2 所示,*Chinmo* 的 let-7-5p 靶位点包含了一个 7-mer 种子配对区"CTACCTC"与 let-7-5p 的种子序列反向互补;而在双翅目以外的昆虫中,该靶位点还包含一个保守的 3′补充配对区"TACAA"与 let-7-5p 的 3′端区域反向互补。如图 3 所示,*Imp* 的 let-7-5p 靶位点在 4 个全变态昆虫类群中均包含一个 7-mer 的种子配对区"TACCTCA",而在膜翅目及鞘翅目中,该位点还存在保守的 3′端补充配对区"ACAA"。

2.4 let-7-5p 与 *Chinmo* 和 *Imp* 靶标关系的验证

为了验证 let-7-5p 与 *Chinmo* 和 *Imp* 基因在非果蝇昆虫中的靶标关系,对 let-7-5p 与家蚕和小菜蛾 *Chinmo* 和 *Imp* 基因的靶标关系进行了双荧光素酶报告系统检测。首先对两个物种 *Chinmo* 及 *Imp* 基因 let-7-5p 靶位点及其上下游区域的序列进行了 RT-PCR 克隆。分别克隆得到 576 bp(家蚕 *Chinmo* 基因,*Bm-Chinmo*),826 bp(小菜蛾 *Chinmo* 基因,*Px-Chinmo*),433 bp(家蚕 *Imp* 基因,*Bm-Imp*)和 596 bp(小菜蛾 *Imp* 基因,*Px-Imp*)的片段。通过比对这些基因的 3′UTR,证实克隆得到的为目的片段。随后将这些 3′UTR 片段连接到萤火虫荧光素酶载体荧光素酶基因的 3′UTR 区域。将该载体与海肾荧光素酶载体及外源的 miRNA mimics 共转染到 293T 细胞中。其中对照组共转染 NC mimics,处理组转染 let-7-5p。4 组实验的结果如图 4 所示,在 4 组实验中,共转染 let-7-5p mimics 的细胞相对共转染 NC mimics 的细胞,其萤火虫荧光素酶活性显著下降($P < 0.0001$),说明 let-7-5p 在 293T 细胞中对家蚕及小菜蛾 *Chinmo* 和 *Imp* 基因 let-7-5p 靶位点具有显著的抑制作用。

物种	*Chinmo*-let-7-5p	*Imp*-let-7-5p	*Zfh-1*-miR-12-5p
黄翅菜叶蜂 *Athalia rosae*	T P M R	T P M R	T
尾蜂 *Orussus abietinus*	T P M R	T P M R	T P R
丽蝇蛹集金小蜂 *Nasonia vitripennis*	T	T P M R	T R
榕小蜂 *Ceratosolen solmsi*	T P M R	T P M R	T
侧沟茧蜂 *Microplitis demolitor*	T P M R	T P M R	T R
佛罗里达弓背蚁 *Camponotus floridanus*	T P M R	T P M R	T P R
意大利蜜蜂 *Apis mellifera*		T P M R	T
白蜡吉丁 *Agrilus planipennis*	T P M R	T P M R	T P M R
金龟 *Onthophagus taurus*	T P M R	T P R	T P
赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*	T P M R	T P R	T P M R
光肩星天牛 *Anoplophora glabripennis*	T P R	T P R	T P M R
马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata*	T P R	T P M R	T P M R
山松大小蠹 *Dendroctonus ponderosae*	T P M R	T R	T P M R
沼石蛾 *Limnephilus lunatus*		T M R	T P M R
小菜蛾 *Plutella xylostella*	T P M R	T P R	T P M R
脐橙螟 *Amyelois transitella*	T P M R	T R	T P M R
家蚕 *Bombyx mori*	T P M R	T P R	T P M R
烟草天蛾 *Manduca sexta*	T P M R	T R	T P M R
庆网蛱蝶 *Melitaea cinxia*	T P M R	T P R	T P M R
君主斑蝶 *Danaus plexippus*	T P M R	T R	T P M R
家蝇 *Musca domestica*	T P R	T	T P M R
黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*	T P R	T	T P R
地中海实蝇 *Ceratitis capitata*	T P R	T	T P M R
瓜实蝇 *Bactrocera cucurbitae*	T R		T P M R
致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus*	T P M R	T P R	
埃及伊蚊 *Aedes aegypti*	T P M R	T R	
冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*	T P M R	T P R	

T　被TargetScan预测得到 Predicted only by TargetScan
M　被Miranda预测得到 Predicted only by Miranda
P　被Pita预测得到 Predicted only by Pita
R　被RNAhybrid预测得到 Predicted only by RNAhybrid

图 1　利用 Miranda，Pita 和 RNAhybrid 预测 *Chinmo* 与 let-7-5p，*Imp* 与 let-7-5p 及 *Zfh*-1 与 miR-12-5p 的互作关系

Fig. 1　Prediction of interaction between *Chinmo* and let-7-5p, *Imp* and let-7-5p, and *Zfh*-1 and miR-12-5p by Miranda, Pita and RNAhybrid

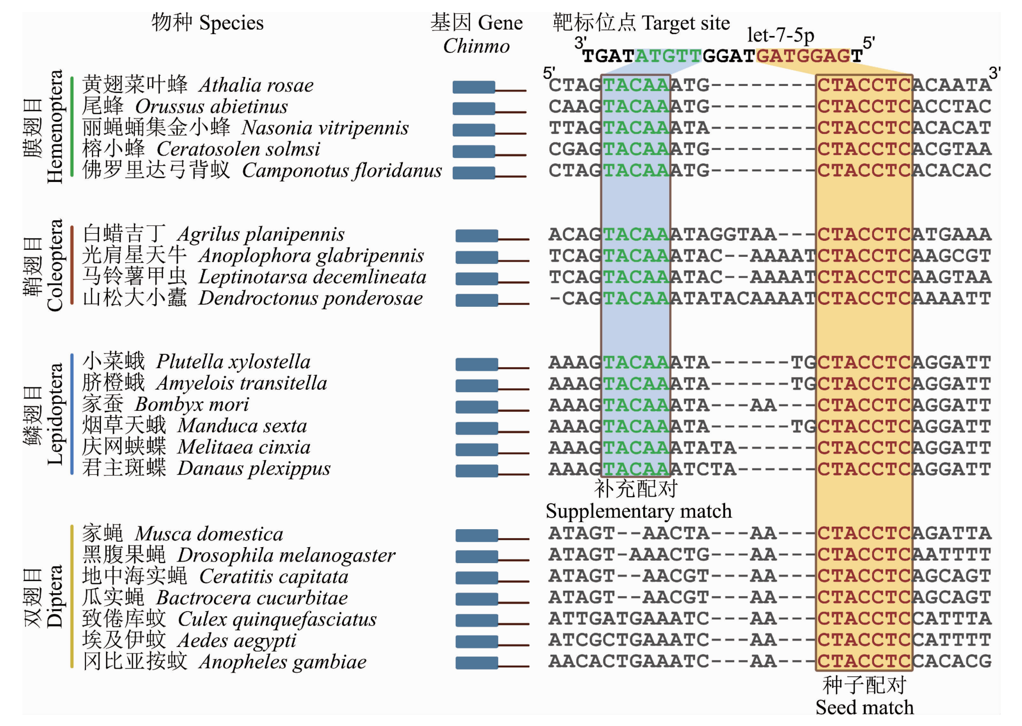


图 2　*Chinmo* 3′UTR 上的保守 let-7 靶位点

Fig. 2　The conserved let-7 target sites on the 3′UTR of *Chinmo*

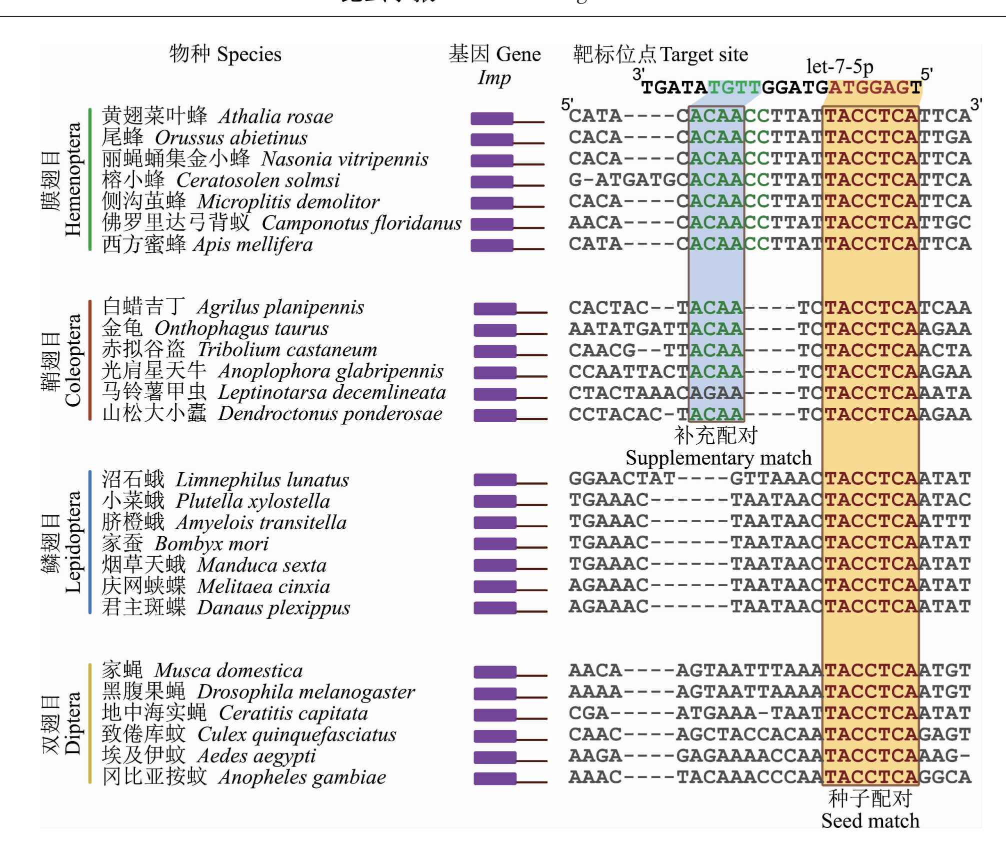


图 3 *Imp* 3′UTR 上的保守 let-7 靶位点

Fig. 3 The conserved let-7 target sites on the 3′UTR of *Imp*

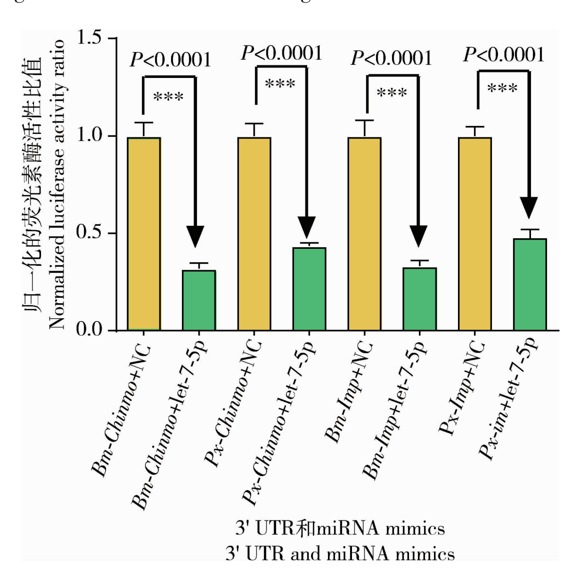


图 4 转染 let-7-5p mimics 到 239T 细胞对荧光素酶相对活性的影响

Fig. 4 Normalized luciferase activity after transfection with let-7-5p mimics into 239T cells

从家蚕和小菜蛾克隆获得 Chinmo 和 Imp 基因的 3′UTR 片段，分别连接到萤火虫荧光素酶载体（pMIR-Report Luciferase）荧光素酶（luciferase）基因 3′UTR 区域。将重组后的载体与海肾萤光素酶载体（Renilla）以 20∶1（v/v）的比例转染到 293T 细胞中，同时在实验组中转染 let-7-5p mimics，在对照组中转染 NC mimics，共转染 48 h 后，测定萤火虫荧光素酶活性与海肾荧光素酶活性。计算萤火虫荧光素酶活性值与海肾荧光素酶活性值的比值，以对照组的比值对实验组的比值进行归一化。图中数据为平均值 ± *SD*；三星号表示处理组与对照组间差异显著（$P < 0.0001$）（双侧 t 测验）。The 3′UTRs of *Chinmo* and *Imp* were cloned from *Bombyx mori* and *Plutella xylostella*, and ligated into the 3′UTR of the luciferase gene of the vector pMIR-Report Luciferase, respectively. The recombinant vector and Renilla (20∶1, v/v) were transfected into 293T cells. Meanwhile, let-7-5p mimics was transfected into 239T cells as the treatment group while NC mimics was transfected as the control group. At 48 h after co-transfection, the firefly luciferase activities and Renilla luciferase activities were determined, and their activity ratio was calculated. The activity ratio in the treatment group was normalized to that in the control group. Data in the figure are mean ± *SD*. The triple asterisks indicate significant difference between the treatment group and the control group ($P < 0.0001$) (two tailed t test).

3 讨论

本结果表明，昆虫精巢干细胞自我更新相关基因的保守 miRNA 靶位点主要集中在 4 个基因 *Zfh*-1，*Chinmo*，*Ken* 和 *Imp* 上，而在 JAK-STAT 信号通路及 Bmp 信号通路的元件基因中只有较少的保守 miRNA 靶位点。*Zfh*-1，*Ken* 和 *Chinmo* 基因均被证明是包囊干细胞自我更新的充分必要条件（Leatherman and Dinardo，2008；Flaherty *et al*.，2010；Issigonis and Matunis，2012）。其功能缺失型突变均会导致包囊干细胞过快分化或丢失。而若在包囊干细胞持续过表达这些基因，会导致包囊干细胞无法正常分化。因此，这些基因的表达对于包囊干细胞的正常发育是不利的。在昆虫包囊干细胞自我更新因子 *Zfh*-1，*Ken* 和 *Chinmo* 基因的 3′UTR 上存在很多保守的 miRNA 靶位点。因此，miRNA 在精巢包囊干细胞分化的过程中可能发挥了"双保险"的作用。如果 *Zfh*-1，*Ken* 和 *Chinmo* 等基因的 mRNA 在包囊干细胞中发生错误转录，则 miRNA 可以抑制这些干细胞自我更新因子 mRNA 的翻译，使其不能产生蛋白产物，从而对干细胞的分化不会造成影响。

在本文对 miRNA 靶标的验证实验中，将预测到的靶标基因 3′UTR 序列连接到携带有萤火虫荧光素酶与海肾荧光素酶的载体中，然后将相应的 miRNA mimics 转染到 239T 细胞中，结果显示，miRNA mimics 能够导致荧光素酶活性下降，显示 miRNA 与靶标基因的 3′UTR 具有相互作用。但本实验未进行突变实验，即将 3′UTR 的互补区突变后再与 mimic 共转染，观察其 miRNA 与 3′UTR 的互作关系是否受到了影响。因此，其互作关系虽然具有很大可信度，但仍需进一步的实验验证，miRNA 在 3′UTR 的作用位置仍需确认。

值得注意的是，很多 miRNA 靶位点仅在某个特定的昆虫类群中保守，这意味着很多 miRNA 与包囊干细胞自我更新因子的靶标关系可能是在昆虫各类群分化之后获得的。考虑到不同昆虫类群的精巢在解剖学上存在很大差异，例如很多双翅目昆虫的精巢仅仅由一个简单的精巢小管构成，而在一些直翅目和膜翅目昆虫的精巢中存在上百个精巢小管。此外，一些昆虫还能产生两种不同功能的精子类型（Gillott，2005）。在昆虫进化过程中，新 miRNA 靶标关系的获得及古老 miRNA 靶标关系的丢失可能也伴随着表型的获得与丢失，这些类群特异性的保守 miRNA 靶标或许与类群特异性的功能有关。

致谢　中国农业科学院蚕业研究所李木旺研究员提供了家蚕材料，贺康博士提供了技术支持，在此表示诚挚的感谢！

参考文献（References）

Ameres SL, Zamore PD, 2013. Diversifying microRNA sequence and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*., 14: 475–488.

Arbouzova NI, Zeidler MP, 2006. JAK/STAT signalling in *Drosophila*: insights into conserved regulatory and cellular functions. *Development*, 133: 2605–2616.

De Cuevas M, Matunis EL, 2011. The stem cell niche: lessons from the *Drosophila* testis. *Development*, 138: 2861–2869.

Enright AJ, John B, Gaul U, Tuschl T, Sander C, Marks DS, 2003. MicroRNA targets in *Drosophila*. *Genome Biol*., 5: 1.

Eun SH, Stoiber PM, Wright HJ, Mcmurdie KE, Choi CH, Gan Q, Lim C, Chen X, 2013. MicroRNAs downregulate Bag of marbles to ensure proper terminal differentiation in the *Drosophila* male germline. *Development*, 140: 23–30.

Flaherty MS, Salis P, Evans CJ, Ekas LA, Marouf A, Zavadil J, Banerjee U, Bach EA, 2010. *chinmo* is a functional effector of the JAK/STAT pathway that regulates eye development, tumor formation, and stem cell self-renewal in *Drosophila*. *Dev. Cell*, 18: 556–568.

Forman JJ, Legesse-Miller A, Coller HA, 2008. A search for conserved sequences in coding regions reveals that the let-7 microRNA targets Dicer within its coding sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105: 14879–14884.

Gilbert LI, 2012. Insect Molecular Biology and Biochemistry. Academic Press, London.

Gillott C, 2005. Entomology. Springer Science & Business Media, The Netherlands. 565–568.

Gu S, Jin L, Zhang F, Sarnow P, Kay MA, 2009. Biological basis for restriction of microRNA targets to the 3′ untranslated region in mammalian mRNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol*., 16: 144–150.

Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O, 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol*., 59: 307–321.

Hardy R, Tokuyasu K, Lindsley D, Garavito M, 1979. The germinal proliferation center in the testis of *Drosophila melanogaster*. *J. Ultrastruct. Res*., 69: 180–190.

Hatfield SD, Shcherbata HR, Fischer KA, Nakahara K, Carthew RW, Ruohola-Baker H, 2005. Stem cell division is regulated by the microRNA pathway. *Nature*, 435: 974–978.

He L, Hannon GJ, 2004. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat. Rev. Genet*., 5: 522–531.

Issigonis M, Matunis E, 2012. The *Drosophila* BCL6 homolog Ken and

Barbie promotes somatic stem cell self-renewal in the testis niche. *Dev. Biol.*, 368: 181 – 192.

Issigonis M, Tulina N, De Cuevas M, Brawley C, Sandler L, Matunis E, 2009. JAK-STAT signal inhibition regulates competition in the *Drosophila* testis stem cell niche. *Science*, 326: 153 – 156.

Katoh K, Standley DM, 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.*, 30: 772 – 780.

Kawase E, Wong MD, Ding BC, Xie T, 2004. Gbb/Bmp signaling is essential for maintaining germline stem cells and for repressing bam transcription in the *Drosophila* testis. *Development*, 131: 1365 – 1375.

Kertesz M, Iovino N, Unnerstall U, Gaul U, Segal E, 2007. The role of site accessibility in microRNA target recognition. *Nat. Genet.*, 39: 1278 – 1284.

Kiger AA, Jones DL, Schulz C, Rogers MB, Fuller MT, 2001. Stem cell self-renewal specified by JAK-STAT activation in response to a support cell cue. *Science*, 294: 2542 – 2545.

Kim D, Pertea G, Trapnell C, Pimentel H, Kelley R, Salzberg SL, 2013. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol.*, 14: R36.

King RC, Akai H, 1984. Insect Ultrastructure. Plenum Publishing, New York. 32 – 58.

Klowden MJ, 2013. Physiological Systems in Insects. Academic Press, London.

Kruger J, Rehmsmeier M, 2006. RNAhybrid: microRNA target prediction easy, fast and flexible. *Nucleic Acids Res.*, 34: W451 – W454.

Leatherman JL, Dinardo S, 2008. *Zfh*-1 controls somatic stem cell self-renewal in the *Drosophila* testis and nonautonomously influences germline stem cell self-renewal. *Cell Stem Cell*, 3: 44 – 54.

Leatherman JL, Dinardo S, 2010. Germline self-renewal requires cyst stem cells and stat regulates niche adhesion in *Drosophila* testes. *Nat. Cell Biol.*, 12: 806 – 811.

Lytle JR, Yario TA, Steitz JA, 2007. Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5′ UTR as in the 3′ UTR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104: 9667 – 9672.

Matunis EL, Stine RR, De CM, 2012. Recent advances in *Drosophila* male germline stem cell biology. *Spermatogenesis*, 2: 137 – 144.

Morgenstern B, 1999. DIALIGN 2: improvement of the segment-to-segment approach to multiple sequence alignment. *Bioinformatics*, 15: 211 – 218.

Pek JW, Lim AK, Kai T, 2009. *Drosophila maelstrom* ensures proper germline stem cell lineage differentiation by repressing microRNA-7. *Dev. Cell*, 17: 417 – 424.

Toledano H, D′alterio C, Czech B, Levine E, Jones DL, 2012. The let-7-Imp axis regulates ageing of the *Drosophila* testis stem-cell niche. *Nature*, 485: 605 – 610.

Tulina N, Matunis E, 2001. Control of stem cell self-renewal in *Drosophila* spermatogenesis by JAK-STAT signaling. *Science*, 294: 2546 – 2549.

Wu YC, Chen CH, Mercer A, Sokol NS, 2012. Let-7-complex microRNAs regulate the temporal identity of *Drosophila* mushroom body neurons via *chinmo*. *Dev. Cell*, 23: 202 – 209.

Yin C, Shen G, Guo D, Wang S, Ma X, Xiao H, Liu J, Zhang Z, Liu Y, Zhang Y, Yu K, Huang S, Li F, 2016. InsectBase: a resource for insect genomes and transcriptomes. *Nucleic Acids Res.*, 44: D801 – D807.

Yoon WH, Meinhardt H, Montell DJ, 2011. miRNA-mediated feedback inhibition of JAK/STAT morphogen signalling establishes a cell fate threshold. *Nat. Cell Biol.*, 13: 1062 – 1069.

Zheng Q, Wang Y, Vargas E, Dinardo S, 2011. *magu* is required for germline stem cell self-renewal through BMP signaling in the *Drosophila* testis. *Dev. Biol.*, 357: 202 – 210.

Zhou X, Duan X, Qian J, Li F, 2009. Abundant conserved microRNA target sites in the 5′-untranslated region and coding sequence. *Genetica*, 137: 159 – 164.

Zoller R, Schulz C, 2012. The *Drosophila* cyst stem cell lineage: partners behind the scenes? *Spermatogenesis*, 2: 145 – 157.

（责任编辑：马丽萍）